

**DESAIN PLASMID REKOMBINAN
pET28A-SUMO NANOBODI**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

**NUSHI CHAIRUNNISA RESMANA
A171093**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA
YAYASAN HAZANAH
BANDUNG
2021**

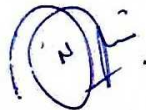
**DESAIN PLASMID REKOMBINAN
pET28A-SUMO NANOBODI**

**NUSHI CHAIRUNNISA RESMANA
A171093**

Oktober 2021

Disetujui Oleh:

Pembimbing



Nur Asni Setiani, M.Si

Pembimbing



Umi Baroroh, S.Si., M.Biotek

Kutipan atau saduran baik sebagian ataupun seluruh naskah, harus menyebut nama pengarang dan sumber aslinya, yaitu Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Skripsi ini saya persembahkan kepada Allah SWT. sebagai rasa syukur atas rahmat dan karunia-Nya serta kepada kedua orang tua saya dan kedua adik saya, keluarga besar tercinta, dosen pembimbing, sahabat, dan teman-teman yang sudah memberikan kasih sayang, doa, dukungan, serta semangat kepada saya.

ABSTRAK

Nanobodi merupakan fragmen antibodi yang ditemukan pada *camelia* dengan kemampuannya dapat mengikat secara selektif dengan antigen tertentu, memiliki kapasitas penetrasi jaringan yang sangat baik dan dapat dengan mudah dimodifikasi untuk tujuan diagnostik atau terapeutik karena ukuran molekulnya yang lebih kecil dari antibodi konvensional. Nanobodi juga memiliki ketahanan terhadap pelarut organik, kelarutannya yang lebih tinggi, dan mudah diekspresi. Menurut hasil penelitian ding dkk., nanobodi dapat berikatan kuat dengan kortisol sehingga bisa dijadikan salah satu komponen untuk kit diagnostik kortisol. Penelitian ini bertujuan untuk konstruksi dna rekombinan nanobodi menggunakan pET28a-SUMO. Urutan asam amino nanobodi yang digunakan diambil dari PDB dengan kode 6ITP yang kemudian ditranslasikan balik menjadi DNA dan dianalisis kodonnya menggunakan GCUA serta dianalisis sisi restriksinya menggunakan *Nbcutter*. Perbanyakan gen nanobodi dilakukan dengan desain primer yang ditambahkan sisi restriksi BamHI dan HindIII sesuai dengan peta plasmid pET28a-SUMO. Analisis insersi gen nanobodi dengan plasmid pET28a-SUMO dilihat dengan cara menganalisis *inframe* atau tidaknya antara nanobodi dan plasmid pET28a-SUMO dengan kesesuaian urutan asam amino nanobodi yang tetap sama. Hasil penelitian yang diperoleh yaitu pasangan primer (primer *forward* 5'-GGATCCCAGGTTTCAGCTGCAGGAA-3' dengan primer *reverse* 5'-GCAAGCTTGTCAGCTGCTAACGGTAAC-3') dan plasmid rekombinan yang diperoleh sebesar 5989bp, dimana gen target (nanobodi) dinyatakan dapat disisipkan ke dalam plasmid (pET28a-SUMO) secara *inframe* tanpa mengubah pembacaan asam aminonya sehingga dapat diekspresikan pada *Escherichia coli*.

Kata Kunci: Nanobodi, kortisol, primer, pET28a-SUMO, DNA rekombinan

ABSTRACT

Nanobodies are antibody fragments found in camellias with the ability to selectively bind to certain antigens, have excellent tissue penetration capacity and can easily be used for diagnostic purposes or because of the smaller molecular size of conventional antibodies. Nanobodies also have resistance to organic solvents, higher solubility, and easy expression. According to the results of research by ding et al., nanobodies can bind strongly to cortisol so that it can be used as a component for a cortisol diagnostic kit. This study aims to construct recombinant DNA nanobodies using pET28a-SUMO. The amino acid sequence of the nanobodies used was from PDB with the code 6ITP which was then translated into DNA and analyzed for codons using GCUA and the restriction site was analyzed using NheI. The nanobody gene propagation was carried out by using a primer design with the addition of restriction sites BamHI and HindIII according to the pET28a-SUMO plasmid map. The analysis of the insertion of the nanobody gene with the pET28a-SUMO plasmid was seen by analyzing the inframe or not between the nanobody and the pET28a-SUMO plasmid with the amino acid sequence of the nanobody remained the same. The results obtained are the primer pair (forward primer 5'-GGATCCCAGGTTTCAGCTGCAGGAA-3' with reverse primer 5'-GCAAGCTTGTCAGCTGCTAACGGTAAC-3') and recombinant plasmid obtained at 5989bp, where the target gene (nanobody) can be inserted into the plasmid (pET28a) -SUMO) in the infrared without changing the amino acid reading so that it can be expressed in Escherichia coli.

Keywords: *Nanobodies, cortisol, primary, pET28a-SUMO, recombinant DNA.*

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim,

Alhamdulillah puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT karena atas segala rahmat dan ridho-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul “**Desain Plasmid Rekombinan pET28a-SUMO Nanobodi**”. Penulisan skripsi ini dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar sarjana pada jurusan Farmasi Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen pembimbing Nur Asni Setiani, M.Si. dan Umi Baroroh, S.Si., M.Biotek. atas bimbingan, nasihat, dukungan serta pengorbanan yang diberikan. Pada kesempatan ini, tidak lupa penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. apt. Adang Firmansyah, M.Si selaku Ketua Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
2. Dr. apt. Dewi Astriany, M.Si selaku Wakil Ketua I Bidang Akademik,
3. apt. Revika Rachmaniar, M.Farm selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,
4. apt. Yola Desnera Putri, M.Si selaku dosen wali yang telah membimbing dan memberi nasihat selama melaksanakan perkuliahan di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
5. Seluruh staf dosen, staf administrasi, serta karyawan Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
6. Kedua orang tua, adik-adik, saudara-saudara, serta keluarga besar penulis yang selalu memberikan dukungan dan doa,
7. Sahabat terdekat Windania, Sheli, Anita, Jeanice dan Trigina yang selalu memberikan dukungan dan membantu dalam proses pengerjaan skripsi serta selama perkuliahan,
8. Teman-teman seperjuangan angkatan 2017 yang telah memberikan inspirasi dan kegembiraan selama penulis kuliah di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,

9. Serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan perhatiannya dalam menyelesaikan skripsi ini.

Dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kesalahan dan kekurangan karena pengetahuan yang masih sangat terbatas. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati diharapkan masukan berupa kritik dan saran yang bersifat membangun untuk perbaikan di masa yang akan datang. Penulis berharap semoga tugas akhir ini akan memberikan manfaat bagi penulis sendiri dan juga bagi pihak lain yang berkepentingan.

Bandung, Oktober 2021

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
KUTIPAN	ii
PERSEMBAHAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Identifikasi Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Kegunaan Penelitian	3
1.5 Waktu dan Tempat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Kortisol	4
2.2 Nanobodi	5
2.3 Teknologi DNA Rekombinan	8
2.3.1 Replikasi DNA	9
2.3.2 Transkripsi DNA	10
2.3.3 Transkripsi Balik	10
2.3.4 Translasi	11
2.3.5 PCR (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)	12
2.3.6 Plasmid	14
2.3.7 Vektor Ekspresi (pET28a-SUMO)	14
BAB III TATA KERJA	17
3.1 Alat	17

3.2 Bahan.....	17
3.3 Metode Penelitian.....	17
3.3.1 Penyiapan DNA Target	17
3.3.2 Penyiapan Vektor Ekspresi	18
3.3.3 Desain Primer	18
3.3.4 Konstruksi Plasmid.....	19
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	20
4.1 Penyiapan DNA Target	20
4.2 Penyiapan Vektor Ekspresi	23
4.3 Desain Primer	25
4.4 Konstruksi Plasmid.....	28
BAB V SIMPULAN DAN ALUR PENELITIAN SELANJUTNYA	30
5.1 Simpulan.....	30
5.2 Alur Penelitian Selanjutnya.....	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	35

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Kodon Asam Amino Nanobodi <i>Preferens Escherichia coli</i>	22
4.2 Hasil Analisis Primer <i>Forward</i> dan Primer <i>Reverse</i> Gen Target.....	25

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur Kimia Kortisol	4
2.2 Skema dari Antibodi Konvensional dan Nanobodi.....	5
2.3 Replikasi DNA.....	9
2.4 Pengembangan Dogma Sentral	10
2.5 Kode Genetik	12
2.6 <i>Codon Usage Escherichia coli</i>	12
4.1 Hasil Analisis <i>Preferens</i> Nanobodi dengan <i>Escherichia coli</i>	21
4.2 Enzim Restriksi pada Gen Target	23
4.3 Peta Plasmid pET28a-SUMO	23
4.4 Sekuen DNA pET28a-SUMO.....	24
4.5 Hasil <i>Inframe</i> Gen Nanobodi dengan pET28a-SUMO	29
4.6 Gen Target, pET28a-SUMO, dan DNA Rekombinan Nanobodi	29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Hasil Analisis GCUA Kodon Nanobodi Sebelum <i>Preferens E. coli</i>	35
2 Hasil Analisis Kodon Nanobodi Sesudah <i>Preferens E. coli</i>	36
3 Hasil Analisis <i>Hairpin, Selfdimer dan Crossdimer</i>	37

DAFTAR PUSTAKA

- Adriana, D.R., George, C., and Hugo, B. 2008. *NeuroImmune Biology, The Hypothalamus Pituitary Adrenal Axis*. Amsterdam: Elsevier.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watter, P. 2002, *Molecular Biology of The Cell*. New York: Garland Science.
- Aminah, Ristieyen, R., dan Tadjuddin N. 2019. "Analisis Cemarkan DNA Tikus pada Bakso Daging Sapi yang Beredar di Makassar dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR)". *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy* 5(1): 93-100.
- Borah, P. 2011. "Primer Designing for PCR." *Colloquium faculty Science Vision* 11: 134-136.
- Brown, T.A. 2010. *Gene Cloning and DNA Analysis*. UK: Wiley Blackwell.
- Cortez, R. V., Backmann, N., Senter, P.D., Wernery, U., De Baetselier P, and Muyldermans, S. 2004. "Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate." *Cancer Res* 64(8): 2853.
- Costa, S., Almeida, A., Castro, A., and Domingues, L. 2014. "Fusion tags for protein solubility, purification, and immunogenicity in *Escherichia coli*." *Frontiers in Microbiology*. 5(63): 1-20.
- Chakravarty, R., Goel, S., and Cai, W. 2014. "Nanobody: the "magic bullet" for molecular imaging." *Theranostics* 4(4): 386-398.
- De Genst, E. 2006. "Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies." *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4586-4591.
- De Vos, J., Devoogdt, N., Lahoutte, T., and Muyldermans, S. 2013. "Camelid single-domain antibody-fragment engineering for (pre)clinical in vivo molecular imaging applications: adjusting the bullet to its target." *Expert Opin Biol Ther* 13:1149-1160.
- Ding, L., Wang, Y., Zhong, P., Jiang, H., Zhao, Z., Zhang, Y., Ren, Z., and Ding, Y. 2019. "Structural insights into the mechanism of single domain VHH antibody binding to cortisol." *FEBS Letters* 593: 1248-1256.
- Diss, T. 2003. *Molecular Biology in Cellular Pathology*. United Kingdom: John Willey and Sons.
- D'Aurizio, F., dan Cantu, M. 2018. "Clinical endokrinologi dan kuantitasi hormon: peningkatan peran spektrometri massa." *Minerva Endocrinol* 43: 261-284.

- Gaffar, S. 2007. *Buku Ajar Bioteknologi Molekul*. Bandung : FMIPA UNPAD.
- Hamers, C. C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., and Songa, E.B. 1993. "Naturally occurring antibodies devoid of light chains". *Nature* 363(6428):446-8.
- Harmesen, M. M., and De Haard H. J. 2007. "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments." *Appl Microbiol Biotechnol* 77:13-22.
- Handoyo, D., dan Rudiretna, A. 2000. "Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR)." *Jurnal Studi Bioteknologi Universitas Surabaya* 9(1): 17-29.
- Hutt, M., Farber-Schwarz, A., Unverdorben, F., Richter, F., and Kontermann, R.E. 2012. "Plasma half-life extension of small recombinant antibodies by fusion to immunoglobulin-binding domains". *J Biol Chem* 287:4462-4469.
- IDT. 2019. Oligo Analyzer. Doi: FM 88954/FM 513 29. P. 1.
- Ingram, J.R., Schmidt, F.I., and Ploegh, H.L. 2018. "Exploiting nanobodies; singular traits." *Annu Rev Immunol* 36: 695-715.
- Jesica, F., dan Friadi, A. 2019. "Hubungan Kadar Kortisol dan Prostaglandin Maternal dengan Persalinan Preterm dan Aterm." *Jurnal Ilmu Keperawatan dan Kebidanan* 10(1): 21.
- Jovcevska, I., and Muyldermans, S. 2020. "The therapeutic potential of nanobodies." *BioDrugs* 34: 11-26.
- Katsu, Y., and Iguchi, T. 2016. "Cortisol." *Handb Horm* 1: 533.
- Li, J., Han, Q., Zhang, T., Du, J., Sun, Q., and Pang, Y. 2018. "Expression of soluble native protein in *Escherichia coli* using a cold shock SUMO tag fused expression vector." *Biotechnology Reports* 19: 1-8.
- Liu, Y., and Huang, H. 2018. "Expression of single-domain antibody in different systems." *Appl Microbiol Biotechnol* 102: 539-551.
- Maksum, I.P., Hassan, K., Sriwidodo, S.T., Gaffar, S., dan Soemitro, S. 2017. *Teknik Biologi Molekular*. Sumedang: Alqaprint.
- Maksum, I.P., Lestari, A., Fauzia, R.P., Rachman, S.D., and Soedjanaatmadja, U.M.S. 2019. "Escherichia coli BL21 (DE3) expression system using TorA signal peptide for recombinant human albumin (rHA) secretion." *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. 10(4): 3319-3324.

- Miller, D.B., and O'Callaghan, J.P. 2002. "Neuroendocrine aspects of the response to stress." *Metabolism*. 51(6): 5-10.
- Mostl, E., and Palme, R. 2002. "Hormones as indicators of stress. *Domest Anim Endocrinol*." 23(2): 67-74.
- Muyldermans, S. 2001. "Single domain camel antibodies: current status." *J Biotechnol* 74(4): 277-302.
- Muyldermans, S. 2013. "Nanobodies: natural single-domain antibodies." *Annual Review of Biochemistry* 82: 775-97.
- Novagen. 1999. *pET System Manual*. United States: Inc Madison.
- Perogamvros, I., Ray, D.W., dan Trainer, P.J. 2012. "Peraturan bioavailabilitas kortisol - efek pada pengukuran dan tindakan hormon." *Nat Rev Endocrinol* 8: 717-727.
- Radji, M. 2011. *Rekayasa Genetika: Pengantar untuk Profesi Kesehatan*. Jakarta: Sagung Seto.
- Richard, J.R., Tamas, V., Janos, P., and Dana, M. 2005. "REBASE-restriction enzymes and DNA methyltransferases." *Nucleic Acids Research* 33: 230-2.
- Salvador, J.P., Vilaplana, L., and Marco, M.P. 2019. "Nanobody: outstanding features for diagnostic and therapeutic applications." *Anal Bioanal Chem* 411: 1703-1713.
- Sandra, M., Cristiane, V., Camila, M., and Mario, J. 2011. "Early Life Stress, HPA Axis, and Depression." *Psychology and Neuroscience* 4(2): 229-234.
- Sasmito, D.E.K., Kurniawan, R., Muhimmah, I. 2014. "Karakteristik primer pada polymerase chain raction (PCR) untuk sekuensing DNA." *Mini Review SNIMed* 93-102.
- Sasnauskas, G., Connolly, B.A., Halford, S.E., Siksny, V. 2007. "Site-specific DNA transesterification catalyzed by a restriction enzyme." *Proc Natl Acad Sci USA* 104(7): 2115-20.
- Schumacher, D., Helma, J., Schneider, A.F.L., Leonhardt, H., and Hackenberger, C.P.R. 2018. "Nanobodies: chemical functionalization strategies and intracellular applications." *Angew Chem Int Ed Engl* 57: 2314-2333.
- Scott, A.M., Wolchok, J.D., and Old, L.J. 2012. "Antibody therapy of cancer." *Nat Rev Cancer* 12(4): 278-87.

- Silaban, S., Gaffar, S., Simorangkir, M., Maksum, I.P., and Subroto, T. 2019. "Construction and optimization of prethrombin-2 human genes in E. coli for the production of active thrombin." *Journal of Physics Conference Series* 1-6.
- Silaban, S., Maksum, I.P., Enus, S., Hasan, K., Subroto, T., dan Soemitro, S. 2016. "Kajian ekspresi gen pretrombin-2 manusia sintetik pada *Escherichia coli* secara in silico untuk produksi trombin sebagai komponen lem fibrin." *Jurnal Pendidikan Kimia*. 8(1): 58-64.
- Silverthorn, D.U. 2007. *Human physiology: an integrated approach*. San Francisco: Pearson Cummings.
- Smith, C., Marks, A.D., and Lieberman, M. 2005. *Basic Medical Biochemistry*. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins.
- Spadiut, O., Capone, S., Krainer, F., Glieder, A., and Herwig, C. 2014. "Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments." *Trends Biotechnol* 32(1): 54-60.
- Tijink, B.M., Laeremans, T., Budde, M., Stigter van, W.M., Dreier, T., and De Haard H.J. 2008. "Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular nanobody technology." *Mol Cancer Ther* 7(8): 88-97.
- Van der, L.R., Frenken, L., De Geus, B., Harmsen, M., Ruuls, R., and Stok, W. 1999. "Comparison of physical chemical properties of llama V HH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies." *Biochim Biophys Acta* 1431(1): 37-46.
- Wang, Z., Li, N., Wang, Y., Wu, Y., Mu, T., Zheng, Y., Huang, L., and Fang, X. 2012. "Ubiquitin-intein and SUMO2-intein fusion systems for enhanced protein production and purification." *Protein Expression and Purification* 82(1): 174-178.
- Wang, Y., Fan, Z., Shao, L., and Kong, X. 2016. "Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications." *Int J Nanomed* 11: 3287-3303.
- Wurm, D.J.L., Veiter, S., Ulonska, B., Eggenreich, C., Herwig, and Spadiut. 2016. "The E. coli pET expression system revisited mechanistic correlation between glucose and lactose uptake." *Applied Microbiology and Biotechnology* 100: 8721-8729.
- Young, C.L., Britton, Z.T., and Robinson, A.S. 2012. "Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications." *Biotechnology Journal* 7(5): 620-634.